



Universidade Federal de São Paulo

Campus Baixada Santista

Beatriz Oliveira Amorim

Estudo do efeito de estimulação elétrica em ratos com
osteoporose induzida pela lesão medular

Santos 2010

Beatriz Oliveira Amorim

Estudo do efeito de estimulação elétrica em ratos com osteoporose induzida pela lesão medular

Trabalho de conclusão de curso apresentado na
Universidade Federal de São Paulo, no Campus
Baixada Santista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em Fisioterapia.

Orientador: Profa Dra Carla Christina Medalha

Santos

Dezembro de 2010

Amorim, Beatriz Oliveira

Estudo do efeito de estimulação elétrica em ratos com osteoporose induzida pela lesão medular/ Beatriz Oliveira Amorim. Santos, 2010

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Campus Baixada Santista, 2010

Curso: Fisioterapia

Orientador: Profa Dra Carla Christina Medalha

1. Lesão Medular. 2. Osteoporose. I. Profa Dra Carla Christina Medalha II. Estudo do efeito de estimulação elétrica em ratos com osteoporose induzida pela lesão medular. III. Santos - Campus Baixada Santista.

CDD 615.82

AMORIM, Beatriz Oliveira

Estudo do efeito de estimulação elétrica em ratos com osteoporose induzida pela lesão medular

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Federal de São Paulo- Campus Baixada Santista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Fisioterapia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profª. Drª. Carla Christina Medalha

INSTITUIÇÃO: UNIFESP

JULGAMENTO: _____

ASSINATURA: _____

Profª. Drª. Ana Claudia Muniz Renno

INSTITUIÇÃO: UNIFESP

JULGAMENTO: _____

ASSINATURA: _____

Prof. Dr. Odair Aguiar

INSTITUIÇÃO: UNIFESP

JULGAMENTO: _____

ASSINATURA: _____

Dedico esse trabalho à minha
família que sempre me
apoiou e incentivou.

Agradecimentos

Agradeço a minha família que me deu condições de cursar a Faculdade de Fisioterapia na UNIFESP, e pela compreensão e incentivo durante todo o meu curso;

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Carla Medalha pelo exemplo de profissionalismo e competência;

Agradeço meus companheiros de laboratório José Simões, Bárbara Caetano e Carolina Goulart pelo apoio durante a realização dos experimentos;

Agradeço a Profa Dra Ana Claudia Renno pela orientação e disponibilidade;

Agradeço aos meus colegas de curso, em especial a Carolina Goulart, Giuliana Di Gangi e Tayla Perosso pelo companheirismo.

Resumo

A osteoporose é uma das complicações que ocorrem após a lesão medular. A desnervação decorrente dessa lesão altera a atividade das células do tecido ósseo, aumentando o número de osteoclastos que são responsáveis pela reabsorção da matriz óssea e a estimulação elétrica visa diminuir essa perda por meio do efeito piezelétrico. Esse estudo analisou a eficácia desse recurso na prevenção da osteoporose induzida pela lesão medular. Dois grupos de animais foram submetidos a lesão medular cirúrgica e tratados por meio da estimulação elétrica de baixa intensidade (frequência de 1.5 MHz, ciclo de trabalho 1:4, intensidade 30 mW/cm²) em 12 sessões de vinte minutos, três vezes por semana, a partir do 1º dia pós-cirúrgico. Após o tratamento os animais foram sacrificados por perfusão transcardíaca, os ossos foram retirados e analisados por densitometria, teste de flexão e análise histológica.

Palavras-chave: Lesão Medular; Campo eletro-magnético; Perda óssea

Abstract

Osteoporosis is a usual complication after spinal cord injury. The denervation deriving from that injury alters the activity of cells in the bone tissue, increasing the number of osteoclasts, which are responsible for the absorption of bone matrix and electrical stimulation aims to reduce that loss through the piezoelectric effect. The aim of the present study was to examine the effectiveness of the electrical stimulation on prevention of osteoporosis induced by spinal cord injury. Two groups of animals were undergone to a surgery inducing the spinal cord injury, and were treated through electrical stimulation of low intensity (frequency of 1.5 MHz, 1:4 cycle of work, 30 mW/cm² intensity) in 12 sessions of twenty minutes, three times a week, from day 1 post-surgery. After treatment the animals were sacrificed by deep anesthesia and bones from posterior limb were removed. The bones were analyzed by densitometry, testing of bending and by histological analysis.

Key-Words: Spinal cord-injury, Electromagnetic field; Bone-loss.

Sumário

1. Introdução	10
2. Objetivo	13
3. Materiais e Métodos	14
3.1 Animais	14
3.2 Procedimentos	14
3.2.1 Cirurgia	14
3.2.2 Cuidados pós-cirúrgicos	14
3.2.3 Tratamento pelo campo eletromagnético	15
3.2.4 Perfusão e Sacrifício	15
4. Análises realizadas	16
4.1 Análise do controle motor	15
4.2 Análise do tecido ósseo	16
4.2.1 Densitometria óssea	16
4.2.2 Análise Biomecânica	16
4.2.3 Análise Histológica	16
4.3 Análise Estatística	17
5. Resultados	17
5.1 Análise do comportamento locomotor	17
5.2 Análise da evolução do peso	18
5.3 Análise morfométrica	18
5.4 Densitometria óssea	20
5.5 Análise biomecânica	21
6. Discussão	21
7. Conclusão	22
8. Referências	23

1. Introdução

O osso é um tecido ricamente innervado (JIANG et al., 2006) e após uma lesão medular seu metabolismo sofre alterações, uma vez que o sistema neural desempenha uma função muito importante na regulação da atividade das células ósseas e na homeostase tecidual (MORSE et al., 2007). Estudos mostram que o número de células como osteoclastos, que se originam das células hematopoéticas e que são responsáveis pela reabsorção da matriz óssea, são formadas em maior quantidade quando ocorre a desnervação. Isso pode ser comprovado por um estudo que revelou um aumento significativo do número de osteoclastos maduros na lâmina de crescimento em ratos que sofreram uma lesão medular (MORSE et al., 2007). A lesão medular (LM) resulta em uma rápida perda de massa óssea que ocorre devido ao aumento da reabsorção e diminuição da sua formação, o que contribui para a desmineralização da trabécula, associada à diminuição de sua espessura (MORSE et al., 2007). Experimentos mostram, também, que há uma redução significativa da massa corporal de ratos lesados (JIANG et al., 2007a). Mudanças decorrentes do aumento da atividade dos osteoclastos, acima da dos osteoblastos, que se originam de células mesenquimais e que são responsáveis pela formação da matriz óssea, podem explicar a perda de regulação entre formação e reabsorção da matriz óssea.

A etiologia da perda de massa óssea após a LM ainda não é totalmente conhecida (JIANG et al., 2007). Estudos mostram que um balanço negativo do cálcio, a deficiência de vitamina D, o aumento de leptina circulante, mudança e inibição de hormônios esteróides, a supressão de TSH na glândula pituitária e a resistência à insulina e a fatores de crescimento insulínicos (IGFs), contribuem para o desenvolvimento da osteoporose após a lesão. A desnervação promove a diminuição da expressão de neuropeptídeos identificados no SNC com um importante papel na função de células da matriz, como vasopressina (VIP), PACAPs, neuropeptídeo Y (NPY), Peptídeo relacionado a calcitonina (CGRP), noradrenalina, glutamato e serotonina (JIANG et al., 2006). Humanos com esse tipo de lesão têm uma diminuição da glicose circulante no corpo devido à redução da massa muscular e à desnervação do sistema músculo-esquelético. Estes efeitos têm sido apontados como causas da resistência à insulina (JIANG et al., 2007). A lesão também gera a diminuição de hormônios sexuais, o que

contribui para a produção e maturação do osteoclasto, favorecendo a reabsorção da matriz óssea.

Um recente estudo mostra estreita relação entre perda de massa óssea com a substância P já que este é um dos fatores que promovem a regulação do osso, mais especificamente do osteoclasto, onde estão localizados os seus receptores. A concentração de substância P nas fibras que inervam os ossos está elevada nos animais lesados, podendo-se concluir, então, que o sistema nervoso exerce um importante papel na patogênese da osteoporose induzida pela LM (LIU et al., 2008).

Estudos experimentais recentes confirmam não só a perda de massa óssea, como também a redução da vascularização, do metabolismo ósseo e dos parâmetros biomecânicos do fêmur de ratos com LM quando comparados com o grupo controle (DING et al., 2010). Esse mesmo estudo mostrou que o calo ósseo formado após a fratura do fêmur dos ratos com LM tem menor volume do que os do grupo controle, porém, com maior proporção de calo mineralizado após duas semanas da fratura.

Há uma teoria de que a hiperplasia vascular que resulta na abertura arteriovenosa leva à redução da nutrição do tecido ósseo, aumento da pressão local, estase venosa e transformação de células mesenquimais em osteoclastos (KAYA et al., 2006). Estudos mostram ainda que o nível da lesão e a severidade não interferem na porcentagem de perda de massa óssea. Sendo assim, pacientes tetraplégicos e paraplégicos não apresentam diferença na densitometria (KAYA et al., 2006; REITERE et al., 2007) quando comparados a indivíduos controle sem lesão. Em contra partida, uma pesquisa que analisou a porcentagem de alteração na densidade óssea em pacientes com tetraplegia e paraplegia mostrou que há uma variação de acordo com o nível de lesão, região analisada e gênero (GARLAND et al., 2008). Mostraram também que o processo de reabsorção óssea é mais ativo em curto prazo (GIANGREGÓRIO et al., 2006) e que o processo de formação óssea não é estimulado em nenhum período (REITERE et al., 2007). Observou-se, também, que há um aumento na concentração plasmática de fósforo, que pode ser explicada pela redução do tecido ósseo e muscular, e na excreção de cálcio e na relação cálcio/creatina na urina (KAYA et al., 2006). Evidenciou-se ainda que elevados níveis de fosfatase alcalina durante o primeiro ano após a lesão que pode refletir no metabolismo ósseo, contribuindo para a reabsorção da matriz. É

relatada também deficiência na vitamina D em pacientes crônicos, o que pode causar um aumento na liberação de paratormônio e conseqüentemente aumentar a reabsorção óssea nesses indivíduos (GIANGREGÓRIO et al., 2006).

Comparando a densidade de massa óssea da região proximal do fêmur com a de uma vértebra lombar, observou-se que da primeira é maior. Acredita-se que isso se deve ao fato de que o estímulo mecânico no indivíduo que permanece sentado em uma cadeira é provavelmente capaz de estimular a atividade osteoblástica na coluna vertebral, enquanto que o fêmur desmineraliza cada vez mais (REITERE et al., 2007). Em relação a espasticidade, evidências na literatura mostram que apesar de pacientes com espasticidade severa terem maior massa muscular, não foi identificada diferença no nível de osteoporose quando comparado com os pacientes com menor espasticidade (LOFVENMARK et al., 2009).

A osteoporose em humanos é uma das complicações inevitáveis da LM, que ocorre predominantemente na pelve e em extremidades inferiores sendo que, até 70% dos indivíduos com a lesão irão sofrer fraturas espontâneas, sendo mais freqüentes na articulação do joelho (JIANG et al., 2006 ; MORSE et al., 2007). A estimulação elétrica (ou pulsed eletromagnetic field – PEMF) existe há 3 décadas e é um tratamento que vem sendo utilizado para acelerar a reparação óssea e tratar fraturas com retardo de consolidação (PILLA et al 2002). De acordo com alguns autores, a estimulação eletromagnética possibilita a proliferação celular causada pelo acoplamento do íon cálcio à ATPase, estimulando o crescimento e reparação óssea (BRIGHTON et al 2001). Segundo Berg e Chang a estimulação elétrica também eleva o potencial de membrana da célula, o que resulta na elevação da condutividade da membrana celular, acelerando seu metabolismo. Ishidou et al (1994) demonstraram também que a utilização do PEMF estimulou a síntese de fator de crescimento TGF, importante na formação óssea, devido à proliferação dos osteoblastos e sua diferenciação e síntese da matriz óssea. Segundo Chang et al. (2006) verificou-se o aumento na taxa de apoptose dos osteoclastos após a exposição ao PEMF de 7,5 Hz, com intensidade de 3,0 mV/cm por 8 e 16 horas.

Devido aos efeitos positivos dos campos eletromagnéticos no metabolismo das células ósseas, bem como na aceleração da consolidação de fraturas ósseas, os efeitos do campo eletromagnético também vem sendo investigados como um recurso na prevenção da perda

de massa óssea bem como no tratamento de osteoporose, tanto em animais como em humanos, com resultados animadores (SERT et al., 2002; STANOSZ et al., 2004; LUO et al., 2005). Os estudos de modo geral relatam que a estimulação através do PEMF acelera o reparo ósseo por um mecanismo que pode ser eficaz na prevenção da perda de massa óssea, como por exemplo, no caso da osteoporose causada por LMs. Porém, ainda não há consenso sobre estes efeitos, bem como sobre os parâmetros que devem ser empregados, frequência de tratamento e efeitos metabólicos.

É consenso que a lesão medular predispõe o corpo a fraturas de baixa energia, sendo que diversas características distinguem a osteoporose pós-lesão medular da pós-menopausa ou da senil (MORSE et al., 2009). Porém, o mecanismo envolvido nessa extrema perda de massa óssea ainda é pouco conhecido (MORSE et al., 2009).

É fundamental entendermos os mecanismos que cercam a osteoporose após a lesão medular uma vez que, dessa forma, será possível desenvolver tratamentos visando a prevenção. (FORREST et. al, 2008).

Sendo a LM uma das grandes causadoras de invalidez de alta incidência e a osteoporose uma conseqüência comum desta afecção, desenhemos o objetivo do presente estudo.

2. Objetivo

Investigar o efeito de estimulação elétrica em ratos com osteoporose induzida pela lesão medular

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram usados ratos Wistar machos, com peso entre 250-300g no dia da cirurgia, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina (CEDEME/UNIFESP) e mantidos em número de quatro por caixa, com temperatura e unidade controladas ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e com livre acesso à água e à comida. Os animais foram divididos em três grupos de animais, Tratado (GCE, n=10), controle lesado (GCL, n=10) e controle Sham (GCS, n=10). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (no. 1617/08).

3.2 Procedimentos

3.2.1 Cirurgia

Os ratos foram anestesiados com Xilazina (13 mg/Kg) e Cetamina (90mg/Kg) e imobilizados no estereotáxico. As vértebras T9 e T10 foram localizadas e era feita tricotomia e incisão posterior, e depois a desobstrução da passagem até o acesso à coluna. O processo espinhoso e a lâmina vertebral eram removidos para exposição da região circular da duramáter, entre o 9º e o 10º níveis medulares torácicos. Quando o acesso à medula era desobstruído, uma lesão medular do tipo considerada total foi induzida pela secção da medula com uma microtesoura cirúrgica (Jiang, 2006). No grupo sham os animais foram submetidos à laminectomia e suturação dos tecidos musculares e pele, sem a lesão medular.

3.2.2 Cuidados pós-cirúrgicos

Todos os cuidados eram tomados para utilização do menor número possível de animais, evitando o estresse e demais formas de desconforto. Foi feita a administração de antibiótico (composto de ampicilina e penicilina; 40 mg/kg; intramuscular) e antiinflamatório (Banamine injetável - Schering Plough S. A.; 1,5 mg/kg, subcutâneo) durante cinco dias após a cirurgia, para profilaxia de infecções e redução da dor. Foi também realizado o esvaziamento manual da bexiga urinária, até a recuperação do reflexo da micção, que geralmente ocorria no período entre cinco dias a duas semanas após a cirurgia. A inspeção diária dos animais até o término do experimento foi necessária também para identificação quaisquer problemas decorrentes da lesão. Uma ração pastosa foi especialmente oferecida aos animais no pós-operatório com o objetivo de facilitar a ingestão do alimento e evitar perda de peso e desidratação.

3.2.3 Tratamento pelo Campo eletromagnético

Os ratos do grupo tratado foram submetidos à estimulação elétrica de baixa intensidade (frequência de 1.5 MHz, ciclo de trabalho 1:4, intensidade 30 mW/cm²) em 12 sessões de vinte minutos, três vezes por semana, a partir do 1º dia pós-cirúrgico. O campo elétrico pulsado de baixa intensidade foi fornecido por uma unidade eletrônica montada no laboratório de eletrônica do Programa de Pós-graduação Bioengenharia da USP/ São Carlos sob supervisão do Prof. Dr. Orivaldo Lopes da Silva. Este equipamento fornece onda de tensão elétrica sinoidal através de acoplamento capacitivo aplicada sobre eletrodos metálicos posicionados nas partes superior e inferior da gaiola dos animais, submetendo o corpo todo do animal a um campo elétrico aproximadamente uniforme. Como o campo elétrico utilizado é de baixa intensidade não provocou qualquer desconforto nos animais. A unidade eletrônica é a mesma do ultra-som pulsado de baixa intensidade já amplamente utilizado e aprovado pela FDA americana para acelerar o reparo ósseo.

3.2.4 Perfusão e sacrifício

Ao final das quatro semanas de tratamento, os animais foram profundamente anestesiados com uretana (1,25mg/Kg; Sigma Aldrich, USA), e sacrificados por perfusão transcardíaca de 120 ml de salina com EDTA (0,1%) a temperatura ambiente seguida de 300 ml de fluido de fixação (paraformaldeído 4%, tampão PBS pH 7.4) por 20 minutos. Foram retirados os ossos tíbia e fêmur. As amostras foram mantidas em solução de fixação e sob refrigeração para posterior análise.

4. Análises realizadas

4.1 Análise do Controle Motor

Os ratos tiveram o desempenho motor analisado semanalmente por meio da Escala Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) (BASSO et al., 1996; BARROS & MOLINA, 2008), que analisa as três articulações das patas posteriores, permitindo o acompanhamento da evolução da lesão. Esta avaliação foi feita nas quatro semanas após a lesão, até o dia do sacrifício, com um intervalo de sete dias. Para esta análise os animais eram colocados em um campo aberto circular de acrílico de 50 cm de altura, 60 cm diâmetro, no qual os animais individualmente eram observados por um período de 4 minutos. A pontuação oscila entre 0 e 21, sendo que 0 corresponde a nenhuma movimentação das patas posteriores, e 21 corresponde a todos os movimentos preservados. A escala BBB leva em

consideração a amplitude de movimento, o número de articulações preservadas, se há o posicionamento da pata e suporte de peso. Por meio desta avaliação foi possível avaliar se houve uma lesão medular e o processo de recuperação dos animais após a intervenção cirúrgica.

4.2 Análise do tecido ósseo

4.2.1 Desitometria óssea

As amostras deste estudo foram submetidas à densitometria óssea do fêmur direito após o sacrifício no mês de junho de 2009. O exame foi realizado na Faculdade de Medicina da USP, utilizando equipamento DEXA Hologic Inc Discovery Model (Bedford, MA, EUA), e analisados por um software específico para pequenos animais, sob a supervisão da Profa Dra Rosa Maria Rodrigues Pereira. O coeficiente de variação do método foi avaliado pela análise da variação de 2 medidas consecutivas após reposicionamento dos animais. A análise da densitometria óssea foi feita por um investigador que não tinha conhecimento da codificação das amostras.

4.2.2 Análise Biomecânica

O teste biomecânico foi realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), através da máquina de ensaio universal Instron, modelo 4444, em temperatura ambiente. Foi utilizada a célula de carga com capacidade máxima de 1 KN e pré-carga de 5N. A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido antero-posterior, por uma haste cilíndrica com um rolete de 2,0 mm de diâmetro fixado na sua extremidade, com velocidade constante de 0,5 cm/min até a fratura do osso. A força aplicada e o deslocamento do travessão da máquina foram monitorados e registrados por meio de um software próprio do equipamento. Desse modo, calcularam-se as curvas de força-deformação para os diversos ensaios. Com esses dados foram calculados a força máxima (N), a rigidez (dF/dx) (N/mm) e a energia de absorção ou resistência (mJ).

4.2.3 Análise histológica

Para análise das propriedades geométricas as tíbias esquerdas foram fixados em formalina e descalcificados (solução descalcificadora de Morse-Citrato de Sódio a 20% e Ácido Fórmico a 50%). Após esse procedimento os ossos foram cortados no ponto médio e as duas metades foram incluídas em blocos de parafina. Para a confecção das lâminas histológicas, foram realizados cortes de 5mc. Em seguida corados com Tricômio de Masson e fotografados através de uma câmera acoplada a um

microscópio (OLYMPUS), com aumento de 40 X. Para a realização da análise das propriedades geométricas foi utilizado um software de análise de imagem Motic2000. Através deste software é possível calcular a área de secção transversal, a área medular e os diâmetros maiores e menores. Para calcular essas medidas, todas as fotos foram padronizadas no mesmo tamanho (800 mc de largura x 640 mc de altura).

4.3 Análise estatística

A distribuição das variáveis foi verificada pelo teste de Shapiro–Wilk's W. Para as variáveis que exibiram distribuição normal as comparações entre os grupos foram feitas pela Análise de Variância de uma via (ANOVA), complementada pelo teste post hoc de Tukey. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para tratamento dos dados da análise morfométrica. O programa Sigma Stat 2.0® foi utilizado e os valores de $P \leq 0,05$ considerados.

5. Resultados

5.1 Análise do comportamento locomotor

Os animais não apresentaram recuperação locomotora o que demonstra que a lesão medular foi bem sucedida (Figura 1). Nenhum animal apresentou recuperação dos movimentos dos membros posteriores a ponto de haver descarga de peso ou contração muscular significativa. O animal que atingiu score 7 em uma das patas foi excluído da análise estatística.

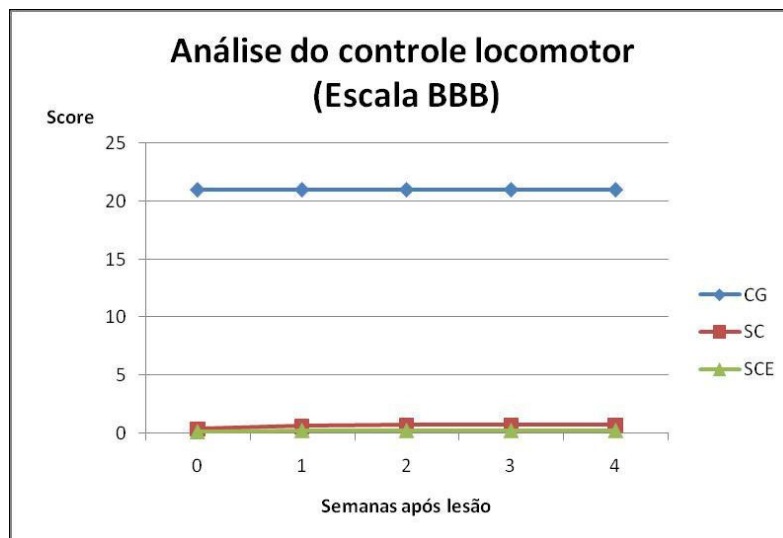


Figura 1. Valores da Escala BBB para os animais dos grupos CG, SC, SCE no pós-operatório e nas 4 semanas seguintes. OP: 24h após a cirurgia. S1-S4: número de semanas após a cirurgia. GCL: grupo

5.2 Análise da evolução dos pesos

Não houve perda significativa de peso nos animais, mas qualitativamente observamos uma redução nas duas primeiras semanas, e um restabelecimento do peso corporal nas semanas seguinte (quadro 1).

Quadro 1. Valores do peso(g) dos animais no pós-operatório e nas 4 semanas seguintes.

	OP	S1	S2	S3	S4
GCL	290.4±21.531	257.6±19.391	248.166±17.600	273.3±15.691	279.2±23.386
GCE	288.9±31.064	254.2±17.781	265.4±17.296	279.6±23.386	295.1±30.974

OP: 24h após a cirurgia. S1-S4: número de semanas após a cirurgia. GCL: grupo controle lesado; GCE: grupo lesado e tratado com o campo elétrico.

5.3 Análise morfométrica

Foi observada uma semelhança do perímetro interno do grupo SHAM com o grupo tratado com Campo Elétrico, sendo estes maiores que o perímetro interno do grupo controle. Observou-se também que as áreas interna e externa tiveram uma redução maior no grupo lesado quando comparado com o tratado com o Campo Elétrico e o SHAM, sendo

que na interna o grupo do campo mostrou-se ser maior que o SHAM e na externa o SHAM mostrou-se ser maior (figuras 2 e 3).

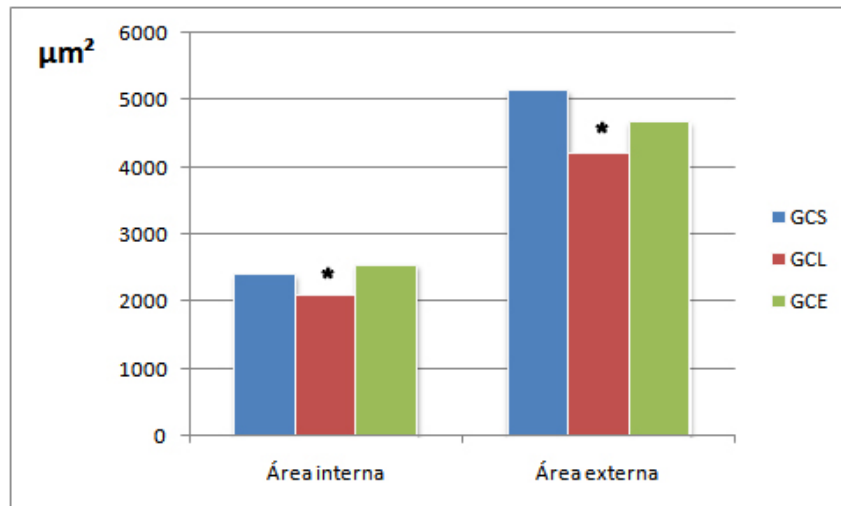


Figura 2. Média±EPM (μm) dos valores obtidos pela análise das áreas das tíbias. GCS: grupo controle sham; GCL: grupo controle lesado; GCE: grupo lesado e tratado com o campo elétrico. *diferente de GCL

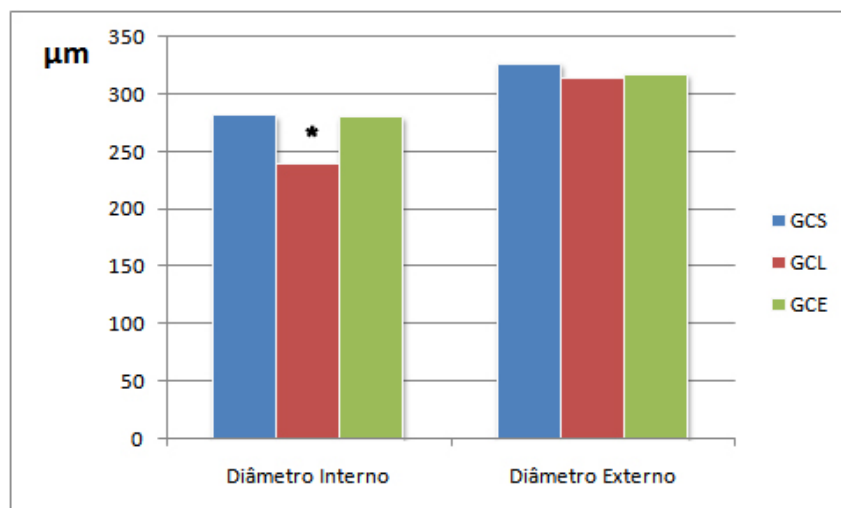


Figura 3. Média±EPM (μm) dos valores obtidos pela análise dos diâmetros das tíbias. GCS: grupo controle sham; GCL: grupo controle lesado; GCE: grupo lesado e tratado com o campo elétrico. *diferente de GCL

5.4 Densitometria óssea

Após análise pela densitometria óssea observamos que não houve diferença estatística entre os grupos (figuras 4 e 5). O que significa que o tratamento com estimulação elétrica de baixa potência não foi eficaz na prevenção da perda de massa óssea (BMC) e da desmineralização (BMD).

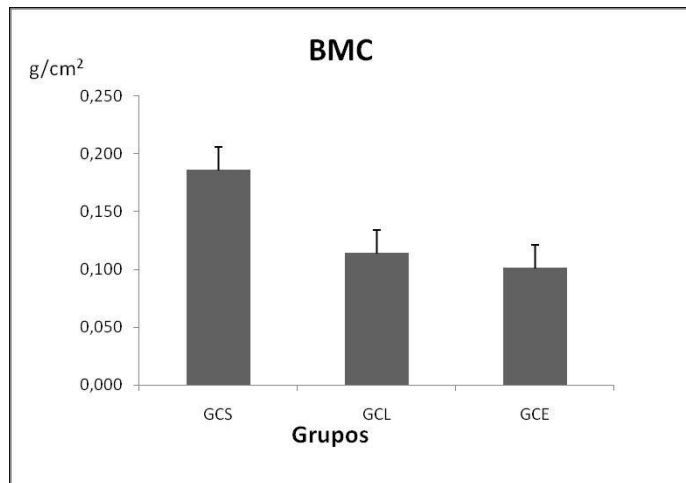


Figura 4. Média±EPM dos valores obtidos de BMC (g/cm²). GCS: grupo controle sham; GCL: grupo controle lesado; GCE: grupo lesado e tratado com o campo elétrico.

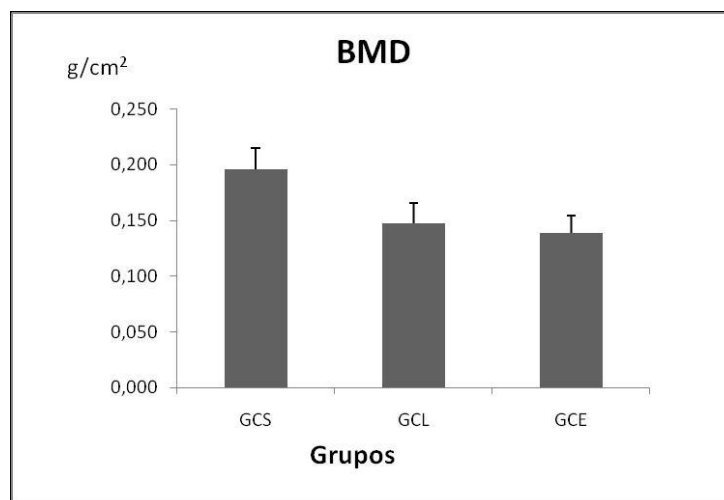


Figura 5. Média±EPM dos valores obtidos de BMD (g/cm²). GCS: grupo controle sham; GCL: grupo controle lesado; GCE: grupo lesado e tratado com o campo elétrico.

5.5 Análise biomecânica

Com a análise biomecânica, foi possível observar que houve uma diferença estatisticamente significativa entre GCL quando comparado com o GCS e o GCE, sendo o GCS com maior carga máxima, seguido do GCL, seguido do GCE (quadro2).

Com relação à resistência foi possível constatar uma diferença estatisticamente significativa entre GCL e o GCS, sendo que no GCS é maior (quadro 2).

Na tenacidade não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos (quadro2).

Já na análise da resiliência foi constatada uma diferença estatisticamente significativa entre o GCL e o GCS e GCE, sendo que no GCS é maior, seguido do GCL, seguido do GCE (quadro 2).

Quadro 2. Média±EPM dos valores obtidos no Ensaio Biomecânico

	Carga Máxima (N)	Resistencia (J)	Tenacidade (J)	Rigidez (n/m)
GCS	0,06878±0,005*	0,03168±0,004*	0,06058±0.015	185,38±10.272*
GCL	0,0336±0.004	0,01865±0.003	0,0373±0.0044	76.092±7.9082
GCE	0,0301±0.001974*	0,01360±0.001642	0,0346±0.003184	51,024±4.2698*
Valor de P	≤0.001	0.002	0.204	≤0.001

GCS: grupo controle sham; GCL: grupo controle lesado; GCE: grupo lesado e tratado com o campo elétrico.
*diferente de GCL

6. Discussão

Pelo fato de o osso ser um tecido altamente innervado, após a lesão medular, esse tecido sofre uma intensa alteração em seu metabolismo (MORSE et al., 2007). Uma de suas consequências é a osteoporose. O mecanismo pelo qual o metabolismo das células osteoclásticas é intensificado não é um consenso na literatura (JIANG et al., 2007).

A redução do metabolismo ósseo, a osteoporose e a redução dos parâmetros biomecânicos citados nos resultados do presente estudo reforçam os dados Ding e colaboradores (2010), que observaram também a redução da vascularização desse tecido.

Sendo a osteoporose, umas das complicações de pacientes lesados medulares crônicos, é fundamental a investigação dos mecanismos pelos quais ela ocorre. Um dos tratamentos promissores descritos na literatura é a estimulação eletromagnética, que possibilita a proliferação celular causada pelo acoplamento do íon cálcio à ATPase, estimulando o crescimento e reparação óssea (BRIGHTON et al 2001).

O presente estudo mostrou que a estimulação elétrica de baixa intensidade (frequência de 1.5 MHz, ciclo de trabalho 1:4, intensidade 30 mW/cm²) em 12 sessões de vinte minutos, três vezes por semana, a partir do 1º dia pós-cirúrgico foi capaz de prevenir a perda tanto da área interna, como da externa, porém sem repercussões nos parâmetros biomecânicos e na densidade óssea, corroborando os dados da literatura de que a estimulação elétrica de baixa potência pode ser um tratamento preventivo de osteoporose induzida pela lesão medular.

Estudos futuros poderão investigar se o tratamento proposto, porém, em outras doses, frequência, ou mesmo em uma lesão não total, é capaz de fazer com que as alterações histológicas tenham repercussão nos parâmetros biomecânicos do osso.

7. Conclusão

De acordo com os resultados descritos, concluímos que o modelo de lesão medular por secção é eficaz no estudo da osteoporose induzida pela lesão medular e que o a estimulação elétrica de baixa intensidade (frequência de 1.5 MHz, ciclo de trabalho 1:4, intensidade 30 mW/cm²) em 12 sessões de vinte minutos, três vezes por semana, a partir do 1º dia pós-cirúrgico foi capaz de prevenir a perda tanto da área interna, como da externa, porém sem repercussões nos parâmetros biomecânicos e na densidade óssea.

8. Referências Bibliográficas

- BARROS, T. E. P.; MOLINA, A. E. L. S. Analysis of the sensitivity and reproducibility of the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) Scale in wistar rats. **Clinics**, v.63(1), p.103-8, 2008.
- BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. Graded Histological and Locomotor Outcomes after Spinal Cord Contusion Usin the NYU Weight-Drop Device versus Transection. **Experimental Neurology**, v. 139, p. 244-256, 1996.
- BRIGHTON, C.T.; WANG, W.; SELDES. R.; ZHANG, G.; POLLACK, S. Signal transduction in electrically stimulated bone cells. **J Bone Joint Surg**, v.83-A, p. 1514-23, 2001.
- CHANG, K.; CHANG, W.H.; TSAI, M.T.; SHIH, C. Pulsed electromagnetic fields accelerate apoptotic rate in osteoclasts. *Connect Tissue Res.*, v. 47(4):222-8, 2006
- CHEN, S. C.; LAI, S. H.; CHAN, W. P.; HUANG, M. H.; TSAI, H. W.; CHEN, J. J. Increases in bone mineral density after functional electrical stimulation cycling exercises in spinal cord injured patients. **Disabil Rehabil**, v. 27, p. 1337-41, 2005.
- FROTZLER, A.; COUPAUD, S.; PERRET, C.; KAKEBEEK, T. H.; HUNKK. J.; HONALDSON, N.; ESER, P. High-volume FES-cycling partially reverses bone loss in people with chronic spinal cord injury. **Bone**, v. 43, p. 169-76, 2008.
- JIANG, S.-D.; JIANG, L.-S.; DAI, L.-Y. Changes in Bone Mass, Bone Structure, Bone Biomechanical Properties, and Bone Metabolism after Spinal Cord Injury: A 6-Month Longitudinal Study in Growing Rats. **Calcif Tissue**, v. 80, p. 167-175, 2007a.
- JIANG, S.-D.; JIANG, L.-S.; DAI, L.-Y. Effects of spinal cord injury on osteoblastogenesis, osteoclastogenesis and gene expression profiling in osteoblast in young rats. **International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation**, v.18, p. 339-349, 2007b.
- JIANG, S.-D.; JIANG, L.-S.; DAI, L.-Y. Mechanisms of osteoporosis is spinal cord injury. **Clinical Endocrinology**, v. 65, p. 555-565, 2006.
- LIRANI, A.P.R. Eletrical field stimulation improves bone mineral density in ovariectomized rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p.1501-1505, 2006.
- LIU, D.; LI, H.; ZHAO, C.; JIANG, L. S.; DAY, L. Y. Canges in Substance P-immunoreactive nerve fiber innervation density in the sublesional bones young growing rats an early stage after spinal cord injury. **Osteoporos Int**, v.19, p.559-569, 2008.
- DING, W. G.; JIANG, S. D.; ZHANG, Y. H.; JIANG, L. S.; DAY, L. Y. Bone loss and impaired fracture healing in spinal cord injured mice. **Osteoporos Int** DOI 10.1007/s00198-010-1256-8

LUO, E.; JIAO, L.; SHEN, G.; WU, X.M.; XU, Q.; LU, L. Effects of the PEMFs of different intensity on BMD and biomechanical properties of rabbits' femur. **Journal of Biomedical Engineering**, v. 22(6), p.1168-70, 2005.

MOHR, T.; PODENPHANT, J.; BIERING-SORENSEN, F.; GALBO, H.; THAMSBORG, G.; KJAER, M. Increased bone mineral density after prolonged electrically induced cycle training of paralyzed limbs in spinal cord injured man. **Calcif Tissue**, v. 61, p. 22-5, 1997.

MORSE, L.; TENG, Y. D.; PHAM, L.; NEWTON, K.; YU, D.; LIAO, W.-L.; KOHLER T.; MÜLLER, R.; GRAVES, D.; STASHENCO, P.; BATTAGLINO, R. Spinal cord injury causes rapid osteoclastic resorption and growth plate abnormalities in growing rats (SCI-induced bone loss in growing rats). **International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation**, v. 19, p. 645-652, 2008.

PILLA, A.A. Low intensity electromagnetic and mechanical modulation of bone growth and repair: are they equivalent? **J Orthop Sci**. v. 7, p. 420-8, 2002

SERT,C.; MUSTAFA, D.; DÃ , M.Z.; AKÂYEN, F.; KAYA, A. The preventive effect in bone loss of 50-Hz, 1-mT electromagnetic field in ovariectomized rats. **J Bone Miner Metab**. V. 20(6), p. 345-9, 2002

STANOSZ, S.; STANOSZ, M.; WYSOCKI, K. The appreciation of bone growth factor in women with osteoporosis exposing on freetransition magnetic : Pol Merkur Lekarski. Sep; 17(99):229-31, 2004.

MORSE L R, Battaglino R A, Stolzmann K L, Hallett L D, Waddimba A, Gagnon D, Lazzarri A A. Osteoporotic fractures and hospitalization risk in chronic spinal cord injury. **Osteoporos Int**. v.20(3), p.385-392, 2009.

KAYA M D, Canan Aybay M D, Sumru Ozel M D, Nilufer Kutay, Ordu Gokkaya M D. Evaluation of Bone Mineral Density in Patients With Spinal Cord Injury. **The Journal of Spinal Cord Medicine**. v.29(4), p. 396-401, 2006.

REITER a I, Volk A, Vollmar J, Fromm B, Gener H J. Changes of basic bone turnover parameters in short-term and long-term patients with spinal Cord injury. **Eur Spine J** (2007) 16:771-776.

GIANGREGORIO L, McCartney N. Bone Loss and Muscle Atrophy in Spinal Cord Injury: Epidemiology, Fracture Prediction, and Rehabilitation Strategies. **The Journal of Spinal Cord Medicine**. V.29, p. 489-500, 2006.

LOFVENMARK, I.; WERHAGEN, L.; NORRBRINK, C. Spasticity and Bone Density after a Spinal Cord Injury. **J Rehabil Med**, v.41, p.1080-1084, 2009.

FORREST G F, Barbeau H, Kirshblum S C, Wilen J, Bond Q, Bentson S, Asselin P, Cirnigliaro C M, Harkema S. Neuromotor and Musculoskeletal Responses to Locomotor Training for an

Individual With Chronic Motor Complete AIS-B **Spinal Cord Injury. The Journal of Spinal Cord Medicine.** V. 31, p. 509-521, 2008.

GARLAND D E, Adkind R H, Stewart C A. Five-Year Longitudinal Bone Evaluations in Individuals With Chronic Complete Spinal Cord Injury. **Spinal Cord Injury. The Journal of Spinal Cord Medicine.** V. 31, p. 543-550, 2008.